

二至丸保肝活性成分群对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用

蔡秀江¹, 丁安伟^{1*}, 闫冰^{1,2}, 姚卫峰¹, 张丽¹, 黄美艳¹

(1. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046; 2. 南京军区南京总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 研究二至丸70%乙醇洗脱部位(AIEP)对四氯化碳(CCl₄)致小鼠急性肝损伤的保护作用。方法: 将60只小鼠随机分成6组: 正常对照组、四氯化碳损伤模型组、AIEP的高、中、低剂量组(19.8, 13.2, 6.6 g·kg⁻¹)和联苯双酯组(150 mg·kg⁻¹)。AIEP高、中、低剂量组每日ig 1次, 共7 d, 末次ig后除正常组外, 其余所有小鼠予ip 0.1% CCl₄ 20 mL·kg⁻¹ 1次, 16 h后处死解剖小鼠, 收集肝组织及血清标本, 测定小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性; 测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力; 计算肝指数并同时对照肝组织进行病理学检查。结果: AIEP高、中剂量组具有明显的剂量依赖性降低CCl₄致小鼠肝损伤血清ALT, AST ($P < 0.01$), 降低肝匀浆中MDA的含量 ($P < 0.01$), 增强SOD的活性 ($P < 0.01$)。通过病理学切片观察, AIEP各剂量组能显著改善肝组织的病理变化 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: AIEP对CCl₄造成的小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用。

[关键词] 二至丸; 保肝; 活性成分群; 四氯化碳; 急性肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0145-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1116.001 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:16

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1116.001.html>

Protective Effects of Active Ingredients Group from Erzhi Pill on Acute Hepatic Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice

CAI Xiu-jiang¹, DING An-wei^{1*}, YAN Bing^{1,2}, YAO Wei-feng¹, ZHANG Li¹, HUANG Mei-yan¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the active ingredients from Erzhi Pill (AIEP) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. **Method:** Sixty Kunming mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, bifendate group (150 mg·kg⁻¹), high AIEP group (19.8 g·kg⁻¹), middle AIEP group (13.2 g·kg⁻¹) and low AIEP group (6.6 g·kg⁻¹). The treatment groups were orally administered once per day for 7 d, whereas the normal and model groups were orally administered with saline. Except normal mice, all the other mice were injected intraperitoneally CCl₄ 20 mL·kg⁻¹ once. The mice were executed 16 h after CCl₄ administration. Serum and liver samples were collected for analysis. The acute hepatic injury model was prepared by CCl₄ injected intraperitoneally. Then, the therapeutic effects of AIEP on the model

[收稿日期] 20110413(002)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81001599); 教育部博士点新教师基金(20103237120010); 江苏省中医药管理局研究项目(LB09031)

[第一作者] 蔡秀江, 硕士研究生, 从事中药炮制学及中药复方机制研究, Tel: 13770605747, E-mail: tashanxj@163.com

[通讯作者] * 丁安伟, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制学及中药复方机制研究, Tel: 025-85811523, E-mail: awding105@163.com

were evaluated by the activity determination of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (ALT and AST), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver, and the hepatic pathological changes following the treatment. **Result:** The activity of ALT and AST and the MDA content in liver were significantly increased and the activity of SOD was largely inhibited in the animals of modeling group. Following the treatment with AIEP, ALT and AST activity and MDA content were significantly reduced and SOD activity was obviously increased in the mice of treatment group. Furthermore, AIEP could ameliorate the hepatic pathological changes. **Conclusion:** AIEP have protective effects on acute hepatic injury induced by CCl_4 in mice.

[**Key words**] Erzhi Pill; liver protection; active ingredients group; carbon tetrachloride; acute hepatic injury

二至丸出自明代吴旻辑的《扶寿精方》^[1],由女贞子(酒蒸)和墨旱莲 2 味中药等量(1:1)组成,属滋阴补肾方剂。二至丸是平补肝肾的代表方,具有益肝肾、补阴血、壮筋骨、乌须发的功效^[2]。临床上用于治疗肝肾阴虚、眩晕耳鸣、咽干鼻燥、腰膝酸软等症^[3]。本文采用四氯化碳(CCl_4)致小鼠急性肝损伤药理模型^[4],通过前期二至丸乙酸乙酯部位对于小鼠急性肝损伤的保护作用的研究表明了该部位显著的保肝活性^[5],本实验进一步研究了乙酸乙酯部位通过聚酰胺柱层析分离,70%乙醇洗脱部位有效成分群(AIEP)对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的保护作用,为筛选出活性最好的效应部位提供重要依据。

1 材料

1.1 药物和试剂 女贞子(批号 090723)和墨旱莲(批号 090919)购于亳州市永刚饮片厂有限公司,经南京中医药大学吴启南教授鉴定符合《中国药典》(2010 年版)项下标准。

AIEP 的制备:将 1 000 g 女贞子与 1 000 g 墨旱莲(1:1)混合后进行常规加工粉碎后过 20 目筛,用水回流提取 3 次,用旋转蒸发器浓缩后用乙酸乙酯萃取,然后通过聚酰胺柱吸附,用 70%乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩至相当于含生药 $0.66 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,置冰箱保存,备用。丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及考马斯亮蓝蛋白试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所;联苯双酯滴丸:北京协和药厂,批号 09040208; CCl_4 :分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 090712,使用时用花生油配制成 0.1%的花生油溶液。

1.2 动物 昆明种小鼠,清洁级,体重(20 ± 2)g,雄性,由南京江宁县汤山青龙山动物繁殖场提供,实验

动物生产许可证 SCXK(苏)2008-0009。

1.3 仪器 ANKE(LXJ-11B)型离心机(上海安寿科学仪器厂),CENTRI-FUGE(AX120)型电子天平(日本产),酶联免疫仪(美国 Bio-Tek 公司),722S 型分光光度仪(上海精密科学仪器公司),KH2200B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 取 60 只小鼠,随机分成 6 组,即正常对照组, CCl_4 损伤模型组,联苯双酯组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),AIEP 的高、中、低剂量组(19.8, 13.2, $6.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组各 10 只小鼠。正常对照组及 CCl_4 模型组给予同量的生理盐水,给药组连续 ig 7 d,于末次给药后 1 h,除正常组 ip 0.9% NaCl 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外,其余各组均 ip 0.1% CCl_4 花生油溶液 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,制作急性肝损伤模型。给予 CCl_4 16 h 后,所有小鼠采用眼眶放血法采血,分离血清,测定血清中 ALT 及 AST 的活性。取血后脱颈处死小鼠,剖腹,取 1 小块肝组织,用生理盐水制备成 10% 的肝匀浆,硫代巴比妥酸法测定每克肝组织中 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力。同时另取相同部位的 1 小块肝组织,用 10% 的福尔马林溶液固定,进行石蜡包埋切片。

2.2 生化指标检测 赖氏法测定血清 ALT,AST 活性,硫代巴比妥酸法测定肝匀浆中 MDA 含量,考马斯亮蓝蛋白法测定肝匀浆中蛋白质含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,按公式计算肝指数。

肝脏指数 = 肝质量(g)/体质量(g) × 100%

2.3 病理学检查 用 10% 的福尔马林溶液固定肝组织,常规石蜡包埋切片(片厚 5 μm),HE 染色,光镜下观察肝组织病理学变化。将肝组织损伤程度分为 4 级:0 级(-),肝组织结构正常,无明显变性,坏死及炎症细胞浸润;I 级(+),肝小叶结构尚正常,

可见明显的混浊肿胀,气球样变或脂肪变性,散在点状坏死;Ⅱ级(++) ,肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润;Ⅲ级(+++) ,肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死,伴有炎症细胞浸润。

2.4 统计学分析 各项数据采取 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成。对肝脏组织病理学变化经 Ridit 分析统计处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清生化指标的影响 模型组血清中 ALT, AST 的含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 说明造模成功。AIEP 在降低小鼠血清 ALT, AST 水平方面作用较好,其中, AIEP 的高、中剂量组与联苯双酯组血清 ALT, AST 值与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 AIEP 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 AST 和 ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常对照	-	47.56 ± 13.18 ²⁾	86.25 ± 17.52 ²⁾
模型	-	225.84 ± 25.69	237.93 ± 19.74
联苯双酯	0.15	156.72 ± 22.85 ²⁾	185.71 ± 16.38 ²⁾
AIEP	19.8	172.48 ± 23.56 ²⁾	196.85 ± 17.46 ²⁾
	13.2	194.52 ± 26.49 ²⁾	212.69 ± 15.87 ²⁾
	6.6	208.63 ± 25.32 ¹⁾	226.41 ± 14.75 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对肝匀浆 MDA 含量, SOD 活性和肝脏指数的影响 由表 2 可见, CCl₄ 肝损伤

模型组小鼠肝脏 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)。AIEP 高、中剂量组、联苯双酯组肝匀浆中 MDA 含量及 SOD 活性与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组小鼠的肝脏指数显著高于空白组 ($P < 0.01$)。AIEP 的高剂量组能显著降低由 CCl₄ 升高的肝脏指数 ($P < 0.01$)。

表 2 AIEP 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA, SOD 和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	肝脏指数 /%
正常对照	-	9.68 ± 2.27 ²⁾	35.72 ± 3.46 ²⁾	4.83 ± 0.76 ²⁾
模型	-	28.35 ± 6.49	14.39 ± 2.85	5.87 ± 0.94
联苯双酯	0.15	14.73 ± 2.58 ²⁾	28.57 ± 4.69 ²⁾	4.96 ± 1.24 ²⁾
AIEP	19.8	16.25 ± 2.62 ²⁾	24.62 ± 5.78 ²⁾	5.18 ± 1.17 ²⁾
	13.2	20.39 ± 6.27 ²⁾	19.73 ± 6.26 ¹⁾	5.34 ± 1.26 ¹⁾
	6.6	24.46 ± 5.85 ¹⁾	17.64 ± 5.49	5.59 ± 1.05 ¹⁾

3.3 对肝组织病理学的影响 正常对照组小鼠肝组织结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞索、肝血窦排列规则,肝小叶结构完整,未见肝细胞变性、坏死等病理变化。CCl₄ 模型组小鼠肝组织结构镜下可见大多数肝细胞浑浊肿胀,细胞质疏松化,有的呈气球样变,以环中央静脉分布的肝细胞灶性或片状坏死,伴炎性细胞浸润等病理改变。AIEP 高、中剂量组的肝细胞坏死,变性及炎性细胞浸润程度的减轻效果较好,比较其他部位病理结果,发现 AIEP 高、中剂量组有较强保护肝损伤作用。结果见表 3,图 1。

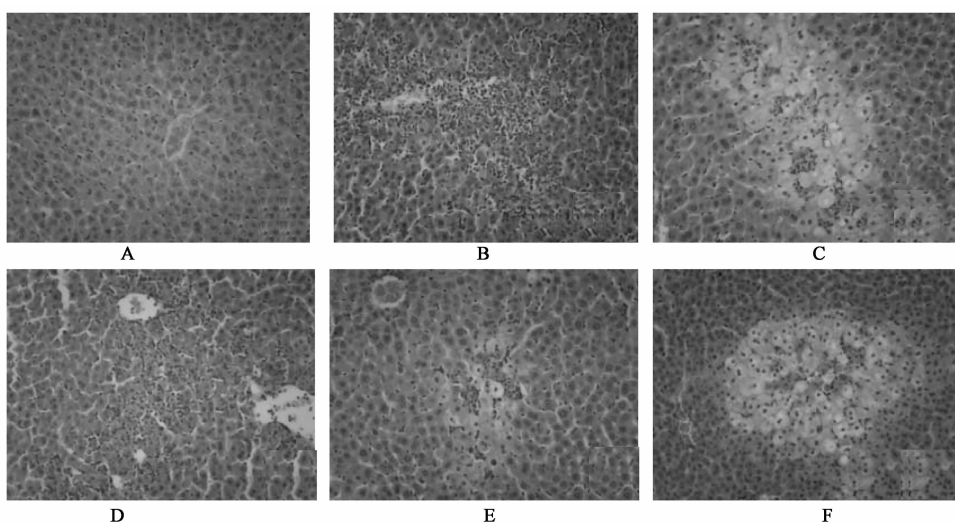
表 3 AIEP 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝组织病理损伤的影响 (n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝细胞变性				肝细胞坏死				炎性细胞浸润			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照	-	9	1	0	0 ²⁾	9	1	0	0	10	0	0	0 ²⁾
模型	-	0	0	2	8	0	0	2	8	0	0	1	9
联苯双酯	0.15	6	4	0	0 ²⁾	5	4	1	0 ²⁾	6	3	1	0 ²⁾
AIEP	19.8	4	4	1	1 ²⁾	4	3	1	2 ²⁾	4	1	3	2 ²⁾
	13.2	2	1	4	3 ¹⁾	3	1	3	3 ²⁾	3	2	2	3 ¹⁾
	6.6	1	2	3	4 ¹⁾	1	1	3	5 ¹⁾	0	2	4	4

4 讨论

化学性肝损伤模型是目前国际上常用的肝损伤模型,具有操作简便、病理模拟性及重复性好等优点^[6]。CCl₄ 所致急性肝损伤模型是最常用的经典模型之一^[7],其机制为 CCl₄ 在肝内经微粒体细胞色素 P450 分解活化,生成活性的三氯甲基基团

(CCl₃⁺),在有氧条件下进一步形成高度活性的三氯甲基过氧化自由基(CCl₃O₂)^[8],诱发脂质过氧化,从而损害肝细胞的细胞膜,使内源性转氨酶释放到细胞外,导致血清中的转氨酶活性显著升高,引起急性肝损伤^[9]。本实验中 CCl₄ 使小鼠血清 ALT, AST 活性显著升高,说明本实验中 CCl₄ 致急性肝损伤模



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 联苯双脂 150 mg·kg⁻¹组;D. AIEP 19.8 g·kg⁻¹组;
E. AIEP 13.2g·kg⁻¹组;F. :AIEP 6.6 g·kg⁻¹组
图 1 各组小鼠肝组织染色(HE, ×100)

型建立成功。实验结果显示, AIEP 各剂量组能有效降低小鼠血清 ALT, AST 活性, 且量效关系明显, 提示 AIEP 具有肝脏保护作用。

SOD 是体内清除自由基、抑制自由基反应的物质基础之一, 它能减少自由基的产生, 减少肝细胞的损伤, 其活性降低则会导致体内氧自由基的积累, 引发质膜的过氧化作用, 使膜结构与功能受到损伤, 最终导致细胞的死亡^[10]。MDA 是脂质过氧化反应的终产物之一, 常用作脂质过氧化的指标^[11]。故 SOD 活性及 MDA 含量常可反映体内脂质过氧化反应程度, 间接反映机体组织、细胞损伤的程度。本实验研究表明, AIEP 高、中剂量组可以明显降低 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量升高, 提高肝组织 SOD 活性, 提示 AIEP 对肝细胞的保护是通过抗自由基、抑制脂质过氧化发挥作用的。

综上所述, AIEP 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤具有保护作用, 该作用机制可能与其抗氧化作用有关, 通过提高 SOD 抗氧化酶的活性, 从而清除自由基, 防止脂质过氧化, 稳定细胞膜结构, 起到保护肝细胞的作用。

[参考文献]

[1] 吴旻. 扶寿精方[M]. 伊泽信恬撰. 北京: 中医古籍出版社, 1986: 11.
[2] 窦志英, 宋坤, 丁安伟. 二至丸对四氯化碳所致小鼠 ALT 升高的预防作用[J]. 天津中医学院学报, 2002,

21(3): 45.

[3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 412.
[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 75.
[5] 闫冰, 丁安伟, 张丽. 二至丸提取物对小鼠四氯化碳急性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3080.
[6] 朴丽花, 金政, 尹哲洙. 悦肝口服液对四氯化碳所致小鼠肝细胞损伤的保护作用[J]. 延边大学医学学报, 2005, 28(2): 89.
[7] Chang M L, Yeh C T, Chang P Y, et al. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(27): 4167.
[8] 宋正己. 实验性肝损伤模型的建立和研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(5): 278.
[9] Palmes D, Spiegel H U. Animal models of liver regeneration[J]. Biomaterials, 2004, 25(9): 1601.
[10] 车勇良. 扇贝多肽(PCF)对 H₂O₂ 损伤胸腺细胞的保护作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(4): 13.
[11] Smith M T, Thor H, Hartzell P, et al. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes[J]. Biochem Pharmacol, 1982, 31(1): 19.

[责任编辑 聂淑琴]